

Attach # 8  
09/938,200

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
—  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
—  
PARIS  
—

①1 N° de publication :  
(à utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

2 732 357

②1 N° d'enregistrement national : 95 04234

⑤1 Int Cl : C 12 N 7/01, A 61 K 48/00

⑫

## BREVET D'INVENTION

35 B1

⑤4 VECTEURS VIRALX ET UTILISATION POUR LE TRAITEMENT DES DESORDRES HYPERPROLIFÉRATIFS, NOTAMMENT DE LA RESTENOSE

②2 Date de dépôt : 31.03.95.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public  
de la demande : 04.10.96 Bulletin 96/40.

④5 Date de la mise à disposition du public du  
brevet d'invention : 30.04.97 Bulletin 97/18.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport  
de recherche :

*Se reporter à la fin du présent fascicule*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : RHONE POULENC RORER  
SA SOCIÉTÉ ANONYME — FR.

⑦2 Inventeur(s) : BRANELLEC DIDIER.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : RHONE POULENC RORER  
SA SOCIÉTÉ ANONYME.

FR 2 732 357 - B1



# RAPPORT DE RECHERCHE

articles L.612-14, L.612-17 et R.612-53 à 69 du code de la propriété intellectuelle

## OBJET DU RAPPORT DE RECHERCHE

Après l'accomplissement de la procédure prévue par les textes rappelés ci-dessus, le brevet est délivré. L'Institut National de la Propriété Industrielle n'est pas habilité, sauf dans le cas d'absence manifeste de nouveauté, à en refuser la délivrance. La validité d'un brevet relève exclusivement de l'appréciation des tribunaux.

L'I.N.P.I. doit toutefois annexer à chaque brevet un "RAPPORT DE RECHERCHE" citant les éléments de l'état de la technique qui peuvent être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention. Ce rapport porte sur les revendications figurant au brevet qui définissent l'objet de l'invention et délimitent l'étendue de la protection.

Après délivrance, l'I.N.P.I. peut, à la requête de toute personne intéressée, formuler un "AVIS DOCUMENTAIRE" sur la base des documents cités dans ce rapport de recherche et de tout autre document que le requérant souhaite voir prendre en considération.

## CONDITIONS D'ÉTABLISSEMENT DU PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

- ☒ Le demandeur a présenté des observations en réponse au rapport de recherche préliminaire.
- ☒ Le demandeur a maintenu les revendications.
- ☐ Le demandeur a modifié les revendications.
- ☐ Le demandeur a modifié la description pour en éliminer les éléments qui n'étaient plus en concordance avec les nouvelles revendications.
- ☐ Les tiers ont présenté des observations après publication du rapport de recherche préliminaire.
- ☐ Un rapport de recherche préliminaire complémentaire a été établi.

## DOCUMENTS CITÉS DANS LE PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

La répartition des documents entre les rubriques 1, 2 et 3 tient compte, le cas échéant, des revendications déposées en dernier lieu et/ou des observations présentées.

- ☒ Les documents énumérés à la rubrique 1 ci-après sont susceptibles d'être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention.
- ☐ Les documents énumérés à la rubrique 2 ci-après illustrent l'arrière-plan technologique général.
- ☐ Les documents énumérés à la rubrique 3 ci-après ont été cités en cours de procédure, mais leur pertinence dépend de la validité des priorités revendiquées.
- ☐ Aucun document n'a été cité en cours de procédure.

**1. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE SUSCEPTIBLES D'ETRE PRIS EN  
CONSIDERATION POUR APPRECIER LA BREVETABILITE DE L'INVENTION**

Référence des documents (avec indication, le cas échéant, des parties pertinentes)	Revendications du brevet concernées
<p>GENOMICS, vol. 24, no. 3, Décembre 1994 pages 535-540, LEPAGE, J.F. ET AL. 'Molecular cloning and localization of the human GAX gene to 7p21' * page 539, colonne 1, dernier alinéa *</p>	1-19
<p>CIRCULATION, vol. 90, no. 4p2, Octobre 1994 page I-635 WALSH, K. ET AL. 'Cell cycle control by the gax homeobox protein in vascular smooth muscle cells' * Abrégé 3420 *</p>	1-19
<p>CIRCULATION, vol. 90, no. 4p2, Octobre 1994 page I-511 WEIR, L. ET AL. 'Gax is rapidly downregulated in rat carotid arteries following balloon injury: in vivo demonstration of a growth-arrest transcription factor' * Abrégé 2747 *</p>	1-19
<p>WO-A-95 02697 (RHONE-POULENC RORER) * le document en entier *</p>	1-19
<p>WO-A-94 11506 (ARCH DEVELOPMENT CORPORATION) * le document en entier *</p>	1-19
<p>HUMAN GENE THERAPY, vol. 6, no. 1, Janvier 1995 pages 41-53, MARCH, K.L. ET AL. 'Pharmacokinetics of adenoviral vector-mediated gene delivery to vascular smooth muscle cells' * le document en entier *</p>	1-19
<p>CIRCULATION, vol. 90, no. 4, Octobre 1994 pages 1648-1656, STEG, P.G. ET AL. 'Arterial gene transfer to rabbit endothelial and smooth muscle cells using percutaneous delivery of an adenoviral vector' * le document en entier *</p>	1-19
<p>SCIENCE, vol. 265, no. 5173, 5 Août 1994 LANCASTER, PA US, pages 781-784, OHNO, T. ET AL. 'Gene therapy for vascular smooth muscle cell proliferation after arterial injury' * le document en entier *</p>	1-19

**2. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE ILLUSTRANT  
L'ARRIERE-PLAN TECHNOLOGIQUE GENERAL**

NEANT

**3. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE DONT LA PERTINENCE  
DEPEND DE LA VALIDITE DES PRIORITES****Référence des documents**  
(avec indication, le cas échéant, des parties pertinentes)**Revendications du  
brevet concernées**

NEANT

## REVENDECATIONS

1. Virus recombinant défectif contenant au moins un gène inséré codant pour tout ou partie de la protéine GAX ou d'un variant de celle-ci.
2. Virus selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il est dépourvu  
5 des régions de son génome qui sont nécessaires à sa réplication dans la cellule infectée.
3. Virus selon la revendication 1 ou 2 caractérisée en ce qu'il s'agit d'un adénovirus, de préférence de type Ad 5 ou Ad 2.
4. Virus selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce qu'il s'agit  
10 d'un adénovirus d'origine animale, de préférence canine.
5. Virus selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisé en ce que le gène inséré code pour tout ou partie de la protéine GAX de rat ou d'un variant de celle-ci.
6. Virus selon la revendication 5 caractérisé en ce que le gène inséré  
15 code pour la protéine GAX de rat ou son homologue humain.
7. Virus selon l'une des revendications 1 à 6 caractérisé en ce que le gène inséré est un ADNc.
8. Virus selon l'une des revendications 1 à 6 caractérisé en ce que le gène inséré est un ADNg.
9. Virus selon l'une des revendications 1 à 8 caractérisée en ce que  
20 le gène inséré comprend des séquences permettant son expression dans la cellule infectée.
10. Virus selon l'une des revendications 1 à 9 caractérisée en ce que  
25 le gène inséré comprend une séquence signal dirigeant le polypeptide synthétisé dans les voies de sécrétion de la cellule cible.
11. Adénovirus selon la revendication 3 ou 4 caractérisé en ce qu'il comprend une délétion de tout ou partie de la région E1.

12. Adénovirus selon la revendication 11 caractérisé en ce qu'il comprend en outre une délétion de tout ou partie de la région E4.

13. Virus selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un virus adéno-associé (AAV).

5           14. Virus selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un rétrovirus.

15. Utilisation d'un virus selon l'une des revendications 1 à 14 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement ou à la prévention des pathologies liées aux désordres hyperprolifératifs.

10           16. Utilisation selon la revendication 15 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement de la resténose.

17. Composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs virus recombinants défectifs selon l'une des revendications 1 à 14.

15           18. Composition pharmaceutique selon la revendication 17 caractérisée en ce qu'elle se présente sous forme injectable et en ce qu'elle comprend de  $10^4$  à  $10^{14}$  pfu/ml d'adénovirus.

20           19. Composition pharmaceutique selon la revendication 18 caractérisée en ce qu'elle contient un adénovirus recombinant imbibé dans un hydrogel.

VECTEURS VIRAUX ET UTILISATION POUR LE TRAITEMENT DES  
DESORDRES HYPERPROLIFERATIFS. NOTAMMENT DE LA RESTENOSE

La présente invention concerne une nouvelle méthode  
5 particulièrement efficace pour le traitement, par thérapie génique, de  
pathologies associées à des désordres hyperprolifératifs. La méthode selon  
l'invention consiste plus particulièrement à bloquer de manière spécifique la  
prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) par transfert  
in vivo du gène *gax*. La méthode de l'invention est tout particulièrement  
10 adaptée au traitement de la resténose post-angioplastie par surexpression  
du gène *gax* dans la paroi vasculaire. Le gène *gax* peut être transféré selon  
la présente invention par des vecteurs viraux. Il s'agit de préférence de  
vecteurs adénoviraux.

15 Différents gènes associés à l'arrêt de la division cellulaire ont été  
isolés. Les gènes *gas* (growth-arrest specific : *gas* 1-6) et *Gadd* (growth-  
arrest and DNA damage-inducible : *Gadd*34, *Gadd*45, *Gadd*153) sont ainsi  
fortement exprimés dans les cellules quiescentes, c'est à dire bloquées en  
phase G0 du cycle cellulaire (Schneider et al., Cell 1988, 54 : 787-793, Del  
20 Sai et al., Cell 1992, 12 : 3514-3521; Cowled et al., Exp.Cell.Res. 1994, 211 :  
197-202; Brancolini et Schneider, J.Cell.Biol. 1994, 124 : 743-756; Zhan et  
al., Mol.Cell.Biol. 1993, 13 : 4242-4250 ; Jackman et al., Cancer Res. 54 :  
5856-5862, 1994). En accord avec ces données d'expression du gène, la  
microinjection de la protéine *gas*-1 bloque la synthèse d'ADN (Del Sai et al.,  
25 Cell, 1992, 70 : 595-607). Inversement, l'addition de facteurs de croissance  
tels que le PDGF ou de sérum de veau fœtal (Platelet-Derived Growth  
Factor) diminue l'expression de ces gènes dans des modèles in vitro (Coccia  
et al. Mol.Cell.Biol. 1992, 12 : 3514-3521). Cette spécificité d'expression vis-  
à-vis de l'état de prolifération cellulaire semble également avoir sa  
30 contrepartie in vivo. Ainsi, le gène *gas*-1 est fortement exprimé dans l'utérus  
de rat après ovariectomie (Ferrero et Cairo, Cell.Biol.Int. 1993, 17, 857-862).  
Dans ce même modèle animal, le traitement par des oestrogènes entraîne  
une prolifération cellulaire qui est reflétée, au niveau de l'utérus, par une  
augmentation de l'expression du proto-oncogène *c-myc* et par une baisse de  
35 l'expression du gène *gas*-1. De manière similaire, dans un modèle de  
prolifération/régénération hépatique, l'expression du gène *gas*-6 est

fortement réduite quatre heures après l'hépatectomie partielle, i.e. dans la période de transition de G0 à G1; elle revient à la normale, probablement une fois la division des hépatocytes initiée (Ferrero et al. J.Cell.Physiol. 1994, 158 : 263-269).

5

La demanderesse s'est intéressé à un nouveau gène, le gène gax (growth arrest specific homeobox), et a maintenant montré que ce gène possède des propriétés particulièrement avantageuses pour des applications de thérapie génique des désordres hyperprolifératifs, notamment de la resténose. Le gène gax a été initialement identifié à partir d'une banque d'ADNc d'aorte de rat. Il code pour une protéine de 303 acides aminés. Sa séquence a été caractérisée et son cDNA cloné (Gorski et al., Mol.Cell.Biol. 1993, 6, 3722-3733). Le gène gax possède certaines propriétés similaires aux gènes gas et Gadd puisqu'il semble également contrôler la transition G0/G1 du cycle cellulaire. Ainsi les niveaux d'ARNm de gax sont réduits dans les CMLV de rat d'un facteur 10 après deux heures d'exposition au PDGF (Gorski et al., Mol.Cell.Biol. 1993, 6, 3722-3733). L'expression du gène gax est donc réprimée au cours de la réponse mitogénique des CMLV.

20

Un avantage de la méthode selon l'invention résident principalement dans la spécificité de l'expression du gène gax. En effet, chez le rat adulte, le gène gax est essentiellement exprimé dans le système cardiovasculaire (aorte, cœur). En revanche, la présence d'ARNm de gax n'a pas été mise en évidence par northern blot dans le foie, le cerveau, l'estomac et le muscle squelettique. La resténose post-angioplastie est un désordre hyperprolifératif localisé qui se développe consécutivement à une intervention non chirurgicale au niveau de la plaque d'athérosclérose. Ainsi, le traitement d'une lésion athéroscléreuse par angioplastie résulte de façon très fréquente (jusqu'à 50% des cas dans certaines études) en une resténose consécutive à la blessure mécanique de la paroi artérielle. Un événement clef de ce mécanisme est la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) de la média vers l'intima, notamment du fait de l'absence de protection et/ou de rétrocontrôle exercé par les cellules endothéliales de l'intima. La capacité d'exprimer

35

sélectivement un gène antiprolifératif selon l'invention dans les cellules CMLV constitue un avantage très important.

Un autre avantage de la méthode selon l'invention réside également dans l'appartenance du gène *gax* à la famille des gènes homéotiques. Ces gènes codent pour des facteurs transcriptionnels qui contiennent des séquences consensus (ou homéodomains) reconnaissant des régions spécifiques de l'ADN (ou homéoboltes) (revue : Gehring et al. Cell, 78 : 211-223, 1994). L'homéodomaine de la protéine *gax* de rat est compris entre les acides aminés 185 et 245. De manière intéressante, les gènes homéotiques identifiés à ce jour sont impliqués dans le contrôle de la différenciation/croissance cellulaire au cours de l'embryogénèse ce qui renforce le potentiel thérapeutique de la méthode selon l'invention (revue : Lawrence et Morata Cell 78 : 181-189, 1994; Krumlauf, Cell 78 : 191-201, 1994).

Un premier objet de l'invention réside donc dans un virus recombinant déficient contenant au moins un gène inséré codant pour tout ou partie de la protéine GAX ou d'un variant de celle-ci. L'invention réside également dans l'utilisation d'un tel virus pour le traitement des pathologies hyperprolifératives.

Dans les virus de l'invention, le gène inséré peut être un fragment d'ADN complémentaire (ADNc), d'ADN génomique (ADNg), ou une construction hybride consistant par exemple en un ADNc dans lequel seraient insérés un ou plusieurs introns. Il peut également s'agir de séquences synthétiques ou semisynthétiques. Comme indiqué ci-avant, il peut s'agir d'un gène codant pour tout ou partie de la protéine GAX ou d'un variant de celle-ci. Au sens de la présente invention, le terme variant désigne tout mutant, fragment ou peptide possédant au moins une propriété biologique de GAX, ainsi que tout homologue de GAX obtenu à partir d'autres espèces. Ces fragments et variants peuvent être obtenus par toute technique connue de l'homme du métier, et notamment par modifications génétique et/ou chimique et/ou enzymatique, ou encore par hybridation ou par clonage par expression, permettant la sélection de variants en fonction de leur activité biologique. Les modifications génétiques incluent les suppressions, délétions, mutations, etc.

Le gène inséré au sens de l'invention est préférentiellement le gène codant pour tout ou partie de la protéine GAX de rat ou de son homologue humain. Il s'agit plus préférentiellement d'un ADNc ou d'un ADNg.

Généralement, le gène inséré comprend également des séquences permettant son expression dans la cellule infectée. Il peut s'agir des séquences qui sont naturellement responsables de l'expression dudit gène lorsque ces séquences sont susceptibles de fonctionner dans la cellule infectée. Il peut également s'agir de séquences d'origine différente (responsables de l'expression d'autres protéines, ou même synthétiques).  
Notamment, il peut s'agir de séquences de gènes eucaryotes ou viraux ou de séquences dérivées, stimulant ou réprimant la transcription d'un gène de façon spécifique ou non et de façon inductible ou non. A titre d'exemple, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome de la cellule que l'on désire infecter, ou du génome d'un virus, et notamment, les promoteurs des gènes E1A, MLP d'adénovirus, le promoteur CMV, LTR-RSV, etc. Parmi les promoteurs eucaryotes, on peut citer également les promoteurs ubiquitaires (HPRT, vimentine, -actine, tubuline, etc), les promoteurs des filaments intermédiaires (desmine, neurofilaments, kératine, GFAP, etc) les promoteurs de gènes thérapeutiques (type MDR, CFTR, facteur VIII, etc) les promoteurs spécifiques de tissus (promoteur de l'actine des cellules du muscle lisse), les promoteurs préférentiellement activés dans les cellules en division, ou encore les promoteurs répondant à un stimulus (récepteur des hormones stéroïdes, récepteur de l'acide rétinolique, etc.). En outre, ces séquences d'expression peuvent être modifiées par addition de séquences d'activation, de régulation, etc. Par ailleurs, lorsque le gène inséré ne comporte pas de séquences d'expression, il peut être inséré dans le génome du virus défectif en aval d'une telle séquence.

Par ailleurs, le gène inséré comprend généralement, en amont de la séquence codante, une séquence signal dirigeant le polypeptide synthétisé dans les voies de sécrétion de la cellule cible. Cette séquence signal peut être la séquence signal naturelle de GAX, mais il peut également s'agir de toute autre séquence signal fonctionnelle (celle du gène de la thymidine kinase par exemple), ou d'une séquence signal artificielle.

Les virus selon la présente invention sont défectifs, c'est-à-dire incapables de se répliquer de façon autonome dans la cellule cible. Généralement, le génome des virus défectifs utilisés dans le cadre de la présente invention est donc dépourvu au moins des séquences nécessaires à la répllication dudit virus dans la cellule infectée. Ces régions peuvent être soit éliminées (en tout ou en partie), soit rendues non-fonctionnelles, soit substituées par d'autres séquences et notamment par le gène inséré. Préférentiellement, le virus défectif conserve néanmoins les séquences de son génome qui sont nécessaires à l'encapsidation des particules virales.

10 Le virus selon l'invention peut être dérivé d'un adénovirus, d'un virus adéno-associé (AAV) ou d'un rétrovirus. Selon un mode de réalisation préféré, il s'agit d'un adénovirus.

Il existe différents sérotypes d'adénovirus, dont la structure et les propriétés varient quelque peu. Parmi ces sérotypes, on préfère utiliser dans le cadre de la présente invention les adénovirus humains de type 2 ou 5 (Ad 2 ou Ad 5) ou les adénovirus d'origine animale (voir demande WO94/26914). Parmi les adénovirus d'origine animale utilisables dans le cadre de la présente invention on peut citer les adénovirus d'origine canine, bovine, murine, (exemple : Mav1, Beard et al., Virology 75 (1990) 81), ovine, porcine, aviaire ou encore simienne (exemple : SAV). De préférence, l'adénovirus d'origine animale est un adénovirus canin, plus préférentiellement un adénovirus CAV2 [souche manhattan ou A26/61 (ATCC VR-800) par exemple]. De préférence, on utilise dans le cadre de l'invention des adénovirus d'origine humaine ou canine ou mixte.

25 Préférentiellement, les adénovirus défectifs de l'invention comprennent les ITR, une séquence permettant l'encapsidation et l'acide nucléique d'intérêt. Encore plus préférentiellement, dans le génome des adénovirus de l'invention, la région E1 au moins est non fonctionnelle. Le gène viral considéré peut être rendu non fonctionnel par toute technique connue de l'homme du métier, et notamment par suppression totale, substitution, délétion partielle, ou addition d'une ou plusieurs bases dans le ou les gènes considérés. De telles modifications peuvent être obtenues in vitro (sur de l'ADN isolé) ou in situ, par exemple, au moyens des techniques

du génie génétique, ou encore par traitement au moyen d'agents mutagènes. D'autres régions peuvent également être modifiées, et notamment la région E3 (WO95/02697), E2 (WO94/28938), E4 (WO94/28152, WO94/12649, WO95/02697) et L5 (WO95/02697). Selon un mode préféré de mise en oeuvre, l'adénovirus selon l'invention comprend une délétion dans les régions E1 et E4. Selon un autre mode de réalisation préféré, il comprend une délétion dans région E1 au niveau de laquelle sont insérés la région E4 et la séquence codant pour GAX (Cf FR94 13355). Dans les virus de l'invention, la délétion dans la région E1 s'étend  
10 préférentiellement des nucléotides 455 à 3329 sur la séquence de l'adénovirus Ad5.

Les adénovirus recombinants défectifs selon l'invention peuvent être préparés par toute technique connue de l'homme du métier (Levero et al., Gene 101 (1991) 195, EP 185 573; Graham, EMBO J. 3 (1984) 2917). En  
15 particulier, ils peuvent être préparés par recombinaison homologue entre un adénovirus et un plasmide portant entre autre la séquence d'ADN d'intérêt. La recombinaison homologue se produit après co-transfection desdits adénovirus et plasmide dans une lignée cellulaire appropriée. La lignée cellulaire utilisée doit de préférence (i) être transformable par lesdits  
20 éléments, et (ii), comporter les séquences capables de compléter la partie du génome de l'adénovirus défectif, de préférence sous forme intégrée pour éviter les risques de recombinaison. A titre d'exemple de lignée, on peut mentionner la lignée de rein embryonnaire humain 293 (Graham et al., J. Gen. Virol. 36 (1977) 59) qui contient notamment, intégrée  
25 dans son génome, la partie gauche du génome d'un adénovirus Ad5 (12 %) ou des lignées capables de compléter les fonctions E1 et E4 telles que décrites notamment dans les demandes n° WO 94/26914 et WO95/02697.

Ensuite, les adénovirus qui se sont multipliés sont récupérés et purifiés selon les techniques classiques de biologie moléculaire, comme  
30 illustré dans les exemples.

Concernant les virus adéno-associés (AAV), il s'agit de virus à ADN de taille relativement réduite, qui s'intègrent dans le génome des cellules qu'ils infectent, de manière stable et site-spécifique. Ils sont capables  
35 d'infecter un large spectre de cellules, sans induire d'effet sur la croissance,

la morphologie ou la différenciation cellulaires. Par ailleurs, ils ne semblent pas impliqués dans des pathologies chez l'homme. Le génome des AAV a été cloné, séquencé et caractérisé. Il comprend environ 4700 bases, et contient à chaque extrémité une région répétée inversée (ITR) de 145 bases environ, servant d'origine de réplication pour le virus. Le reste du génome est divisé en 2 régions essentielles portant les fonctions d'encapsidation : la partie gauche du génome, qui contient le gène rep impliqué dans la réplication virale et l'expression des gènes viraux; la partie droite du génome, qui contient le gène cap codant pour les protéines de capsid du virus.

L'utilisation de vecteurs dérivés des AAV pour le transfert de gènes in vitro et in vivo a été décrite dans la littérature (voir notamment WO 91/18088; WO 93/09239; US 4,797,368, US5,139,941, EP 488 528). Ces demandes décrivent différentes constructions dérivées des AAV, dans lesquelles les gènes rep et/ou cap sont délétés et remplacés par un gène d'intérêt, et leur utilisation pour transférer in vitro (sur cellules en culture) ou in vivo (directement dans un organisme) ledit gène d'intérêt. Les AAV recombinants défectifs selon l'invention peuvent être préparés par co-transfection, dans un lignée cellulaire infectée par un virus auxillaire humain (par exemple un adénovirus), d'un plasmide contenant la séquence nucléique d'intérêt bordée de deux régions répétées inversées (ITR) d'AAV, et d'un plasmide portant les gènes d'encapsidation (gènes rep et cap) d'AAV. Les AAV recombinants produits sont ensuite purifiés par des techniques classiques. L'invention concerne donc également un virus recombinant dérivé des AAV dont le génome comprend une séquence codant pour GAX bordée des ITR de l'AAV. L'invention concerne également un plasmide comprenant une séquence codant pour GAX bordée de deux ITR d'un AAV. Un tel plasmide peut être utilisé tel quel pour transférer la séquence de GAX, éventuellement incorporé dans un vecteur liposomal (pseudo-virus).

Concernant les rétrovirus, la construction de vecteurs recombinants a été largement décrite dans la littérature : voir notamment EP 453242, EP178220, Bernstein et al. Genet. Eng. 7 (1985) 235; McCormick, BioTechnology 3 (1985) 689, etc. En particulier, les rétrovirus sont des virus intégratifs, infectant les cellules en division. Le génome des rétrovirus

comprend essentiellement deux LTR, une séquence d'encapsidation et trois régions codantes (gag, pol et env). Dans les vecteurs recombinants dérivés des rétrovirus, les gènes gag, pol et env sont généralement délétés, en tout ou en partie, et remplacés par une séquence d'acide nucléique hétérologue d'intérêt. Ces vecteurs peuvent être réalisés à partir de différents types de rétrovirus tels que notamment le MoMuLV ("murine moloney leukemia virus"; encore désigné MoMLV), le MSV ("murine moloney sarcoma virus"), le HaSV ("harvey sarcoma virus"); le SNV ("spleen necrosis virus"); le RSV ("rous sarcoma virus") ou encore le virus de Friend.

10 Pour construire des rétrovirus recombinants comportant une séquence codant pour GAX selon l'invention, un plasmide comportant notamment les LTR, la séquence d'encapsidation et ladite séquence codante est généralement construit, puis utilisé pour transfecter une lignée cellulaire dite d'encapsidation, capable d'apporter en trans les fonctions rétrovirales déficientes dans le plasmide. Généralement, les lignées d'encapsidation sont donc capables d'exprimer les gènes gag, pol et env. De telles lignées d'encapsidation ont été décrites dans l'art antérieur, et notamment la lignée PA317 (US4,861,719); la lignée PeiCRIP (WO90/02806) et la lignée GP+envAm-12 (WO89/07150). Par ailleurs, les rétrovirus recombinants peuvent comporter des modifications au niveau des LTR pour supprimer l'activité transcriptionnelle, ainsi que des séquences d'encapsidation étendues, comportant une partie du gène gag (Bender et al., J. Virol. 61 (1987) 1639). Les rétrovirus recombinants produits sont ensuite purifiés par des techniques classiques.

25 Pour le traitement de la resténose, il est tout particulièrement avantageux d'utiliser un adénovirus recombinant défectif. Les adénovirus possèdent en effet une forte capacité à infecter les cellules musculaires lisses vasculaires en prolifération. Ceci permet d'utiliser des quantités relativement faibles de principe actif (adénovirus recombinant), et permet également une action efficace et très rapide sur les sites à traiter. Les adénovirus de l'invention sont également capables d'exprimer à hauts niveaux le gène gaz introduit, ce qui leur confère une action thérapeutique très efficace. De plus, en raison de leur caractère épisomal, les adénovirus de l'invention ont une persistance limitée dans les cellules prolifératives et donc un effet transitoire parfaitement adapté à l'effet thérapeutique recherché.

35

La présente invention concerne également une composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs virus recombinants défectifs tels que décrits précédemment. De telles compositions peuvent être formulées en vue d'une administration par voie topique, orale, parentérale, intranasale, 5 intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, etc.

Préférentiellement, la composition selon l'invention contient des véhicules pharmaceutiquement acceptables pour une formulation injectable, notamment pour une injection au niveau de la paroi vasculaire. Il peut s'agir en particulier de solutions salines (phosphate monosodique, disodique, 10 chlorure de sodium, potassium, calcium ou magnésium, etc, ou des mélanges de tels sels), stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables. Il peut également s'agir d'un hydrogel préparé à partir de tout polymère (homo ou 15 hétéro) bio-compatible et non cytotoxique. De tels polymères ont par exemple été décrits dans la demande WO93/08845. Certains d'entre eux, comme notamment ceux obtenus à partir d'oxyde d'éthylène et/ou de propylène sont commerciaux.

Dans leur utilisation pour le traitement des pathologies liées aux 20 désordres hyperprolifératifs, les adénovirus recombinants défectifs selon l'invention peuvent être administrés selon différents modes, et notamment par injection. Préférentiellement, pour le traitement de la resténose, les adénovirus de l'invention sont administrés directement au niveau de la paroi vasculaire au moyen d'un ballon d'angioplastie enrobé d'un film hydrophile 25 (par exemple un hydrogel) imbibé des adénovirus ou de tout autre cathéter contenant une chambre d'infusion pour la solution adénovirale, qui peut ainsi être appliqué de manière précise sur le site à traiter, et permettre une libération locale et efficace des adénovirus au niveau des cellules à traiter. Cette méthode d'administration permet avantageusement d'infecter un 30 pourcentage élevé de cellules de la média (jusqu'à 9,6%), qui constituent la cible préférentielle pour le traitement de la resténose, alors que les méthodes d'administration classiques (injection intraveineuse par exemple) ne permettent pas d'infecter de manière très significative ces cellules.

La méthode de traitement de l'invention consiste avantageusement à 35 introduire, au niveau du site à traiter, une composition comprenant un

hydrogel imbibé d'adénovirus recombinants. L'hydrogel peut être déposé directement sur la surface du tissu à traiter, par exemple au cours d'une intervention chirurgicale. Avantagusement, l'hydrogel est introduit au niveau du site à traiter au moyen d'un cathéter, par exemple d'un cathéter à ballonnet, notamment lors de l'angioplastie. De manière particulièrement avantageuse, l'hydrogel imbibé est introduit au niveau du site à traiter au moyen d'un cathéter à ballonnet.

Les doses de virus utilisées pour l'injection peuvent être adaptées en fonction de différents paramètres, et notamment en fonction du mode d'administration utilisé et de la durée du traitement recherchée. D'une manière générale, les virus recombinants selon l'invention sont formulés et administrés sous forme de doses comprises entre  $10^4$  et  $10^{14}$  pfu/ml. Pour les AAV et les adénovirus, des doses de  $10^6$  à  $10^{10}$  pfu/ml peuvent également être utilisées. Le terme pfu ("plaque forming unit") correspond au pouvoir infectieux d'une suspension de virions, et est déterminé par infection d'une culture cellulaire appropriée, et mesure, généralement après 48 heures, du nombre de plages de cellules infectées. Les techniques de détermination du titre pfu d'une solution virale sont bien documentées dans la littérature.

La présente invention offre un nouveau moyen très efficace pour le traitement ou la prévention des pathologies liées aux désordres hyperprolifératifs tels que la resténose.

En outre, ce traitement peut concerner aussi bien l'homme que tout animal tel que les ovins, les bovins, les animaux domestiques (chiens, chats, etc), les chevaux, les poissons, etc.

La présente invention est plus complètement décrite à l'aide des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

#### **LEGENDE DES FIGURES**

- Figure 1** : Représentation du plasmide pCO1.  
**Figure 2** : Représentation du plasmide pXL-CMV-Gax HA.

**Figure 3** : Localisation nucléaire de la protéine GAX-HA dans les CMLV transfectées par pXL-CMV-Gax HA.

Figure 3A : CMLV transfectées par le vecteur pCGN (absence d'insert GAX)

5      Figure 3B : CMLV transfectées par le vecteur pXL-CMV-Gax HA

**Figure 4** : Localisation nucléaire de la protéine GAX-HA dans les CMLV traitées par Ad-CMV-Gax.

**Figure 5** : Effet de Ad-CMV-GAX sur la prolifération de CMLV (t=24 heures)

- 10      - Les CMLV sont comptées 24 heures après le traitement par Ad-CMV-Gax (1000pfu/cellule) ou par un adénovirus contrôle (Ad-RSV- $\beta$ Gal, 1000 pfu/cellule). La croissance cellulaire est bloquée (0,5% SVF) ou stimulée (SVF 20%).

**Figure 6** : Effet de Ad-CMV-GAX sur la prolifération de CMLV (t=48 heures)

- 15      - Les CMLV sont comptées 48 heures après le traitement par Ad-CMV-Gax (1000pfu/cellule) ou par un adénovirus contrôle (Ad-RSV- $\beta$ Gal, 1000 pfu/cellule). La croissance cellulaire est bloquée (0,5% SVF) ou stimulée (SVF 20%).

**Figure 7** : Effet de Ad-CMV-Gax sur la viabilité de CMLV incubées en présence de sérum de veau foetal (SVF 20%).

- 20      - conditions expérimentales cf. figure 6

Figure 7A : cellules non traitées par adénovirus

Figure 7B : cellules traitées par Ad-RSV- $\beta$ Gal

Figure 7C : cellules traitées par Ad-CMV-Gax

## 25      **TECHNIQUES GENERALES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE**

30      Les méthodes classiquement utilisées en biologie moléculaire telles que les extractions préparatives d'ADN plasmidique, la centrifugation d'ADN plasmidique en gradient de chlorure de césium, l'électrophorèse sur gels d'agarose ou d'acrylamide, la purification de fragments d'ADN par électroélution, les extraction de protéines au phénol ou au phénol-chloroforme, la précipitation d'ADN en milieu salin par de l'éthanol ou de l'isopropanol, la transformation dans Escherichia coli, etc ... sont bien connues de l'homme de métier et sont abondamment décrites dans la littérature [Maniatis T. et al., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold

Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982; Ausubel F.M. et al. (eds), "Current Protocols In Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987).

Les plasmides de type pBR322, pUC et les phages de la série M13 sont d'origine commerciale (Bethesda Research Laboratories).

Pour les ligatures, les fragments d'ADN peuvent être séparés selon leur taille par électrophorèse en gels d'agarose ou d'acrylamide, extraits au phénol ou par un mélange phénol/chloroforme, précipités à l'éthanol puis incubés en présence de l'ADN ligase du phage T4 (Biolabs) selon les recommandations du fournisseur.

Le remplissage des extrémités 5' proéminentes peut être effectué par le fragment de Klenow de l'ADN Polymérase I d'E. coli (Biolabs) selon les spécifications du fournisseur. La destruction des extrémités 3' proéminentes est effectuée en présence de l'ADN Polymérase du phage T4 (Biolabs) utilisée selon les recommandations du fabricant. La destruction des extrémités 5' proéminentes est effectuée par un traitement ménagé par la nucléase S1.

La mutagenèse dirigée in vitro par oligodéoxynucléotides synthétiques peut être effectuée selon la méthode développée par Taylor et al. [Nucleic Acids Res. 13 (1985) 8749-8764] en utilisant le kit distribué par Amersham.

L'amplification enzymatique de fragments d'ADN par la technique dite de PCR [Polymérase-catalyzed Chain Reaction, Saiki R.K. et al., Science 230 (1985) 1350-1354; Mullis K.B. et Faloona F.A., Meth. Enzym. 155 (1987) 335-350] peut être effectuée en utilisant un "DNA thermal cycler" (Perkin Elmer Cetus) selon les spécifications du fabricant.

La vérification des séquences nucléotidiques peut être effectuée par la méthode développée par Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 5463-5467] en utilisant le kit distribué par Amersham.

Exemple 1 : construction du vecteur pXL-CMV-Gax<sub>HA</sub> portant le gène codant pour la protéine gax de rat sous le contrôle du promoteur CMV.

Cet exemple décrit la construction d'un vecteur contenant l'ADNc codant pour la protéine gax (espèce : rat) et des séquences adénovirales permettant une recombinaison. L'épitope de l'hémagglutinine du virus

- influenza (épitope HA1), comprenant 18 acides aminés, est ajouté à l'extrémité N-terminale de la protéine gax (Field et al., Mol.Cell.Biol. 8 : 2159-2165, 1988). Ce procédé d'addition d'épitope permet de suivre, notamment par des techniques d'immunofluorescence, l'expression de gax à l'aide d'anticorps dirigés contre l'épitope HA1. Outre sa sensibilité, cette méthode permet de s'affranchir du bruit de fond correspondant à l'expression de protéines gax endogènes à la fois *in vitro* et *in vivo*.

### 1.1. Construction du plasmide pCO1

#### 10 A - Construction du plasmide pCE

- Le fragment EcoRI-XbaI correspondant à l'extrémité gauche du génome de l'adénovirus Ad5 a d'abord été cloné entre les sites EcoRI et XbaI du vecteur pIC19H. Ceci génère le plasmide pCA. Le plasmide pCA a ensuite été coupé par HinfI, ses extrémités 5' proéminentes ont été remplies par le fragment de klenow de l'ADN polymérase I de E.coli, puis il a été coupé par EcoRI. Le fragment ainsi généré du plasmide pCA qui contient l'extrémité gauche du génome de l'adénovirus Ad5 a ensuite été cloné entre les sites EcoRI et SmaI du vecteur pIC20H (Marsh et al., Gene 32 (1984) 481). Ceci génère le plasmide pCB. Le plasmide pCB a ensuite été coupé par EcoRI, ses extrémités 5' proéminentes ont été remplies par le fragment de klenow de l'ADN polymérase I de E.coli, puis il a été coupé par BamHI. Le fragment ainsi généré du plasmide pCB qui contient l'extrémité gauche du génome de l'adénovirus Ad5 a ensuite été cloné entre les sites NruI et BglII du vecteur pIC20H. Ceci génère le plasmide pCE dont une caractéristique intéressante est qu'il possède les 382 premières paires de bases de l'adénovirus Ad5 suivies d'un multisite de clonage.

#### B - Construction du plasmide pCD'

- Le fragment Sau3A (3346) - SstI (3645) et le fragment SstI (3645) - NruI (5519) du génome de l'adénovirus Ad5 ont tout d'abord été ligaturés et clonés entre les sites ClaI et BamHI du vecteur pIC20H, ce qui génère le plasmide pPY53. Le fragment Sall-TaqI du plasmide pPY53 préparé à partir d'un contexte dam-, contenant la partie du génome de l'adénovirus Ad5 comprise entre les sites Sau3A (3346) et TaqI (5207) a ensuite été cloné entre les sites Sall et ClaI du vecteur pIC20H, ce qui génère le plasmide

pCA'. Le fragment TaqI (5207) - NarI (5519) du génome de l'adénovirus Ad5 préparé à partir d'un contexte dam- et le fragment Sall-TaqI du plasmide pCA' ont ensuite été ligaturés et clonés entre les sites Sall et NarI du vecteur pIC20H. Ceci génère le plasmide pCC'. Le fragment NarI (5519) - NruI (6316) du génome de l'adénovirus Ad5 préparé à partir d'un contexte dam- et le fragment Sall-NarI du plasmide pCC' ont ensuite été ligaturés et clonés entre les sites Sall et NruI du vecteur pIC20R. Ceci génère le plasmide pCD'.

#### C - Construction du plasmide pC01

Une digestion partielle par XhoI puis une digestion complète par Sall du plasmide pCD' génère un fragment de restriction qui contient la séquence de l'adénovirus Ad5, du site Sau3A (3446) au site NruI (6316). Ce fragment a été cloné dans le site Sall du plasmide pCE. Ceci génère le plasmide pC01 (figure 1), qui contient la partie gauche de l'adénovirus Ad5 jusqu'au site HinfI (382), un multisite de clonage et le fragment Sau3A (3446) - NruI (6316) de l'adénovirus Ad5.

#### 1.2. Construction du vecteur pXL-CMV-Gax<sup>HA</sup> (cf. figure 2)

L'ADNc de Gax a été cloné entre les sites XbaI-BamHI du vecteur pCGN (Tanaka et Herr, Cell 60 : 375-386, 1990). Le vecteur pGCN-Gax résultant contient les promoteur précoce et séquence enhancer du cytomégalovirus (CMV) (-522, +72; Boshart et al, Cell, 41 : 521-530, 1985), la séquence leader de la thymidine kinase de de l'Herpes simplex virus incluant le codon d'initiation AUG ainsi que les les trois premiers acides aminés (+55, +104; Rusconi et Yamamoto, EMBO J., 6 : 1309-1315, 1987), la séquence codant pour l'épitope HA1 [Y P Y D V P D Y A S L G G P (SEQ ID N° 2)], l'ADNc de gax de rat et enfin la séquence de poly adénylation du gène de  $\beta$ -globine de Lapin (Pábo et al, cell, 35 : 445-453, 1983).

Le vecteur pCGN-Gax a ensuite été coupé par XmnI et SfiI et le fragment obtenu, contenant promoteur, ADNc et séquence de polyadénylation, préalablement traité à la Klenow, a été introduit au site EcoRV du vecteur navette pC01 contenant les séquences adénovirales nécessaires à la recombinaison. Le plasmide obtenu a été désigné pXL-CMV-Gax<sup>HA</sup> (cf. figure 2).

Exemple 2 : mise en évidence des propriétés d'inhibition de prolifération du plasmide pXL-CMV-gax HA.

5 Cet exemple décrit les procédures opératoires qui permettent de mettre en évidence *in vitro* la qualité des vecteurs (cf. exemple 1) permettant la recombinaison homologue, à la fois en expression (détection de la protéine gax et de l'épitope HA) et en activité (effet sur la prolifération cellulaire).

10 Les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) sont mises en culture par digestion enzymatique d'aorte de lapin NZW selon une méthode adaptée de Chamley et al. (Cell Tissue Res. 177 : 503-522 1977).  
Brièvement, une fois prélevée, l'aorte de lapin est incubée pendant 45 minutes en présence de collagénase (collagénase II, Cooper Biomédical) à  
15 37°C. Il est procédé alors à une deuxième digestion, en présence de collagénase et d'élastase (Biosys) pendant environ 2 heures, ce qui permet d'obtenir une suspension cellulaire. Les cellules sont maintenues en présence de 20% de sérum de veau foetal et utilisées pour l'ensemble des tests (cf. infra) avant le dixième passage. Dans l'ensemble des expériences,  
20 les cellules musculaires lisses sont caractérisées par immunomarquage à l'aide d'anticorps anti- $\alpha$ SM-actine (F-3777, Sigma).

Afin de contrôler la qualité des vecteurs d'expression (cf. exemple 1), la présence et la localisation de la protéine gax sont contrôlées par  
25 immunofluorescence pour chaque construction. Pour cela, les cellules musculaires lisses ou les cellules 3T3 sont transfectées par les plasmides pXL-CMV-Gax<sup>HA</sup> et pCGNgax en présence d'un mélange DOSPA/DOPE (Lipofectamine, Gibco BRL). Les cellules sont incubées en présence du complexe ADN/liposomes dans un milieu de culture ne contenant pas de  
30 sérum de veau foetal, pendant 4 à 8 heures (durée optimale : 8 heures pour les CML). Après 24 heures d'incubation en présence de sérum de veau foetal, les cellules sontensemencées sur lame (Titertek) en vue de l'immunofluorescence, pendant de nouveau 24 heures. Les cellules sont alors fixées en présence de paraformaldéhyde 4% puis perméabilisées par  
35 addition de triton 0,1%. Après saturation en présence d'albumine bovine

(BSA, Sigma), on procède successivement à l'addition des anticorps anti-HA (12CA5, Boehringer Mannheim) puis des anticorps conjugués à la fluorescéine.

5 Les expériences d'immunofluorescence effectuées à la fois sur  
cellules NIH3T3 et sur culture primaire de CMLV de lapin démontrent que le  
plasmide pCGNgax mais également le plasmide "navette" pXL-CMV-Gax  
HA codent bien pour une protéine à localisation nucléaire (cf. Figure 3A :  
plasmide témoin; 3B : plasmide pXL-CMV-Gax HA). En outre, après  
10 extraction des protéines nucléaires de cellules transfectées par pXL-CMV-  
Gax HA, nous avons pu mettre en évidence par western blot une protéine  
révélée par les anticorps dirigés contre l'épitope HA.

L'effet des vecteurs ci-dessus sur la prolifération cellulaire a ensuite  
été vérifié. Pour ce faire, une méthode indirecte a été utilisée, reposant sur  
15 la mesure de la formation de colonies. Brièvement, des cellules  
embryonnaires de souris NIH3T3 ont été utilisées pour effectuer des tests  
de formation de colonies selon une méthode adaptée de Schweighoffer et  
al. (Mol.Cell.Biol. 1993, 13 : 39-43). Brièvement, les cellules sont co-  
transfectées par un plasmide portant le gène de résistance à la néomycine  
20 et par un excès du vecteur d'intérêt (pCGNgax ou pXL-CMV-Gax HA ).  
Après une période de sélection en G418, les colonies sont colorées par une  
solution de fuchsine phéniquée (Diagnostica, Merck) et dénombrées. Les  
résultats d'une expérience représentative décrites dans le tableau I  
démontrent une diminution du nombre des colonies dans les cellules  
25 transfectées par pCGNgax.

Tableau 1

condition de transfection des cellules 3T3	nombre de colonies après sélection en G418
pCGN (5µg) + pSV2neo (1µg) (§)	183±28 (*)
pCGNgax (5µg) + pSV2neo (1µg)	93±11

5

(§) vecteur contrôle pCGN : absence d'insert gax

(\*)  $p < 0,01$

### Exemple 3 : Construction de l'adénovirus recombinant Ad-CMVgax.

10

Le vecteur pXL-CMV-Gax<sup>HA</sup> préparé dans l'exemple 1 a ensuite été linéarisé et cotransfecté pour la recombinaison avec un vecteur adénoviral déficient, dans les cellules helper (lignée 293) apportant en *trans* les fonctions codées par les régions E1 (E1A et E1B) d'adénovirus.

15

L'adénovirus Ad-CMVgax a été obtenu par recombinaison homologue *in vivo* entre l'adénovirus Ad.RSVBgai (Stratford-Perricaudet et al., J. Clin. Invest 90 (1992) 626) et le vecteur pXL-CMV-Gax<sup>HA</sup> selon le protocole suivant : le vecteur pXL-CMV-Gax<sup>HA</sup> linéarisé par l'enzyme XmnI et l'adénovirus Ad.RSVBgai linéarisé par ClaI ont été co-transfectés dans la lignée 293 en présence de phosphate de calcium pour permettre la

20

recombinaison homologue. Les adénovirus recombinants ainsi générés ont été sélectionnés par purification sur plaque. Après isolement, l'adénovirus recombinant est amplifié dans la lignée cellulaire 293, ce qui conduit à un surageant de culture contenant l'adénovirus déficient recombinant non purifié ayant un titre d'environ  $10^{10}$  pfu/ml.

25

Les particules virales sont purifiées par centrifugation sur gradient de chlorure de césium selon les techniques connues (voir notamment Graham et al., Virology 52 (1973) 456). L'adénovirus Ad-CMVgax est conservé à -80°C dans 20 % de glycérol.

**Exemple 4 : Mise en évidence des propriétés d'inhibition de la prolifération de l'adénovirus Ad-CMVgax.**

Cet exemple décrit les procédures expérimentales qui permettent de  
5 démontrer la qualité de l'adénovirus recombinant à la fois en terme de production de la protéine gax et en terme d'activité biologique (effet sur la prolifération cellulaire).

Les CMLV d'aorte de lapin sont incubées en présence de  
10 l'adénovirus Ad-CMVgaxHA et d'un adénovirus témoin (ad-RSV $\beta$ Gal : adénovirus recombinant exprimant la  $\beta$ -galactosidase sous le contrôle du promoteur RSV) dilué dans du milieu de culture (DMEM, 0,5% SVF). Après environ une heure à 37°C en atmosphère humide, le milieu contenant la solution adénovirale est aspiré et remplacé par du milieu de culture (DMEM,  
15 0,5% SVF) pour une période de 18 à 24 heures. Le milieu riche en SVF (concentration finale : 20%) est alors ajouté afin de stimuler la prolifération cellulaire et les cellules dénombrées 24 heures et 48 heures plus tard.

En outre, 24 heures après l'addition de la solution adénovirale,  
20 l'expression de la protéine gax par les CMLV est contrôlée par les techniques décrites dans l'exemple 2, à savoir un marquage nucléaire par immunofluorescence (localisation de la protéine) mais également par western blot. La protéine produite par l'adénovirus recombinant est bien révélée par des anticorps reconnaissant l'épitope HA et a la même mobilité  
25 électrophorétique que la protéine gax détectée dans le noyau de CMLV transfectées par pCGNgax ou pXL-CMV-Gax HA. La figure 4 illustre la localisation de la protéine Gax au niveau de CMLV incubées en présence de Ad-CMVgaxHA.

30 Les résultats d'une expérience représentative, décrits dans la figure 4, démontrent une forte baisse du nombre des cellules après l'addition du virus Ad-CMVgaxHA. En revanche, une telle réduction du nombre de cellules n'est pas observée après traitement par l'adénovirus contrôle utilisé à la même concentration (M.O.I. 1000). Nous avons en parallèle vérifié par  
35 immunofluorescence que cette forte multiplicité d'infection permet

d'exprimer soit le gène marqueur  $\beta$ -gal (utilisation d'anticorps anti  $\beta$ -gal de E.Coli, Monosan) soit la protéine gax (utilisation d'anticorps anti-HA, cf. exemple 2) dans plus de 90% de la population des CMLV de lapin.

L'addition de virus ad-RSV- $\beta$ gal est associée à un faible effet  
5 cytotatique (-13%) après 24 heures de culture en présence de sérum de veau foetal (20%). Dans les mêmes conditions expérimentales, le traitement par Ad-CMVgaxHA entraîne une diminution de 57% du nombre de cellules (cf. Figure 5). L'activité biologique du virus Ad-CMVgaxHA est bien évidemment amplifiée après 48 heures de culture voire associée à une mort  
10 cellulaire (cf. Figure 6 et 7).

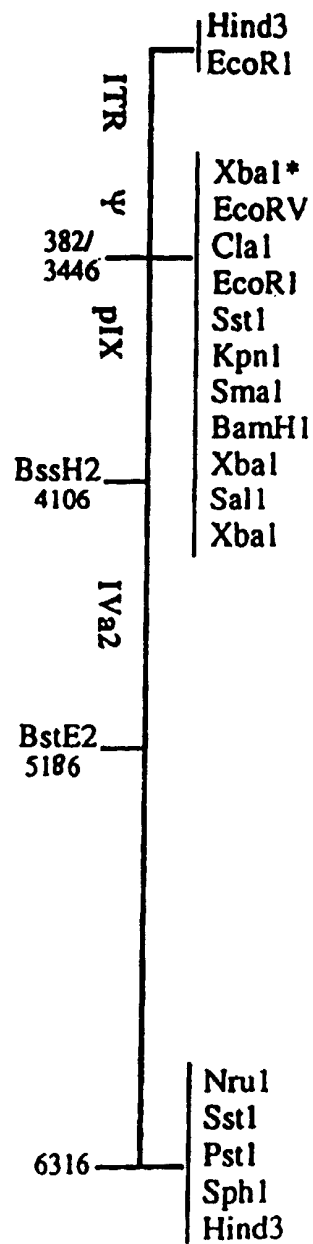
Ainsi le blocage de la prolifération provoqué par Ad-CMVgaxHA est associé à une forte réduction du nombre de cellules qui est détectable après une période de culture de 24 heures (cf. Figure 5). De manière intéressante, cet effet de Ad-CMVgaxHA est observé sur les cellules stimulées par une  
15 forte concentration de SVF (20%) et non sur les cellules privées de SVF (0,5%) (cf. figure 6). Cet exemple montre donc qu'un adénovirus recombinant codant pour la protéine gax est capable de bloquer de manière efficace la division cellulaire sans affecter de manière importante la viabilité de cellules bloquées dans leur cycle en G0.

20 L'effet de l'adénovirus Ad-CMVgaxHA sur la viabilité des CMLV en culture est également illustré par la figure 7.

Les propriétés inhibitrices de Ad-CMVgaxHA sur la synthèse d'ADN  
25 sont confirmées par des expériences d'incorporation de bromodésoxyuridine (BrdU). Brièvement, 24 heures après l'addition d'adénovirus, les CMLV sont incubées en présence de SVF (10 à 20%) et de BrdU (10 $\mu$ M) qui s'incorpore à la place de la thymine dans les cellules en phase de synthèse de l'ADN et peut être révélée par des anticorps spécifiques. L'incorporation  
30 de BrdU est quantifiée par cytométrie de flux.

La même méthodologie de cytométrie de flux peut être utilisée afin de visualiser la progression dans le cycle cellulaire de CMLV de lapin traitées par Ad-CMVgaxHA. Le traitement par Ad-CMVgaxHA s'accompagne d'un blocage du cycle cellulaire en phase G0/G1.

35



Plasmide pCO1

Figure 1

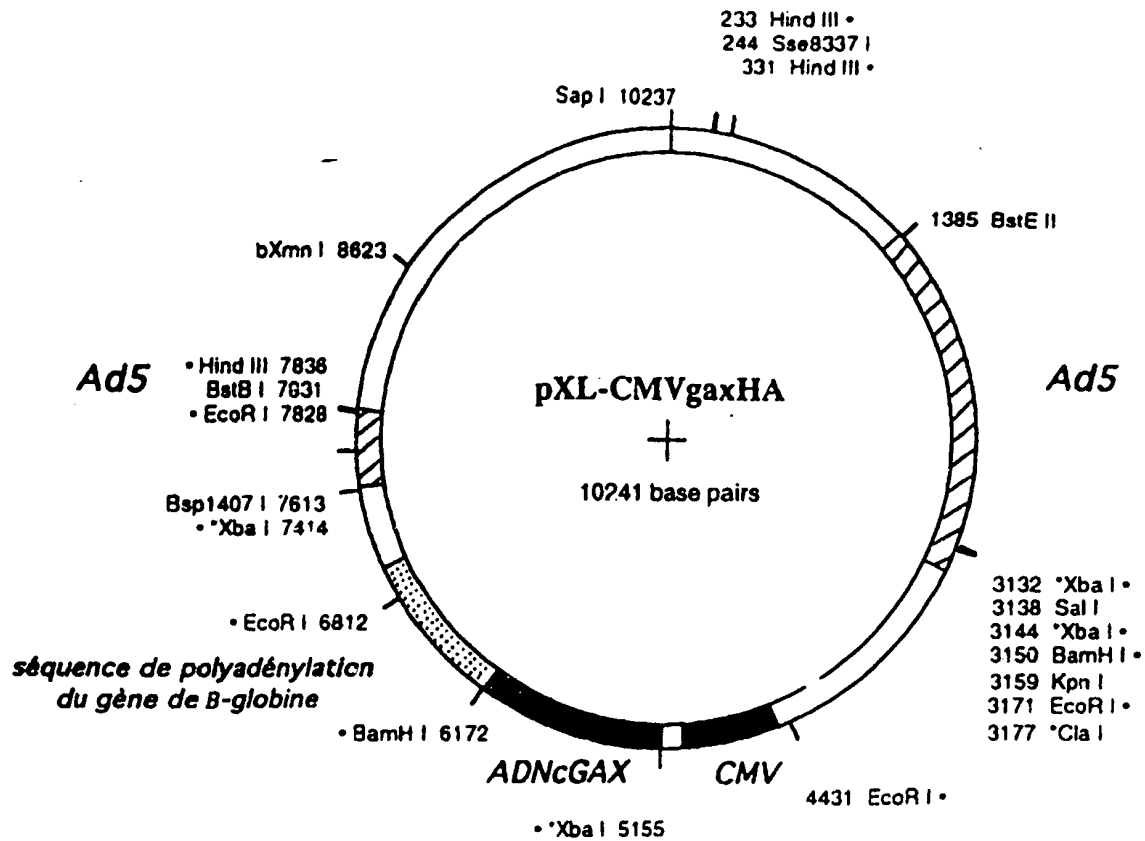


Figure 2



Figure 3A

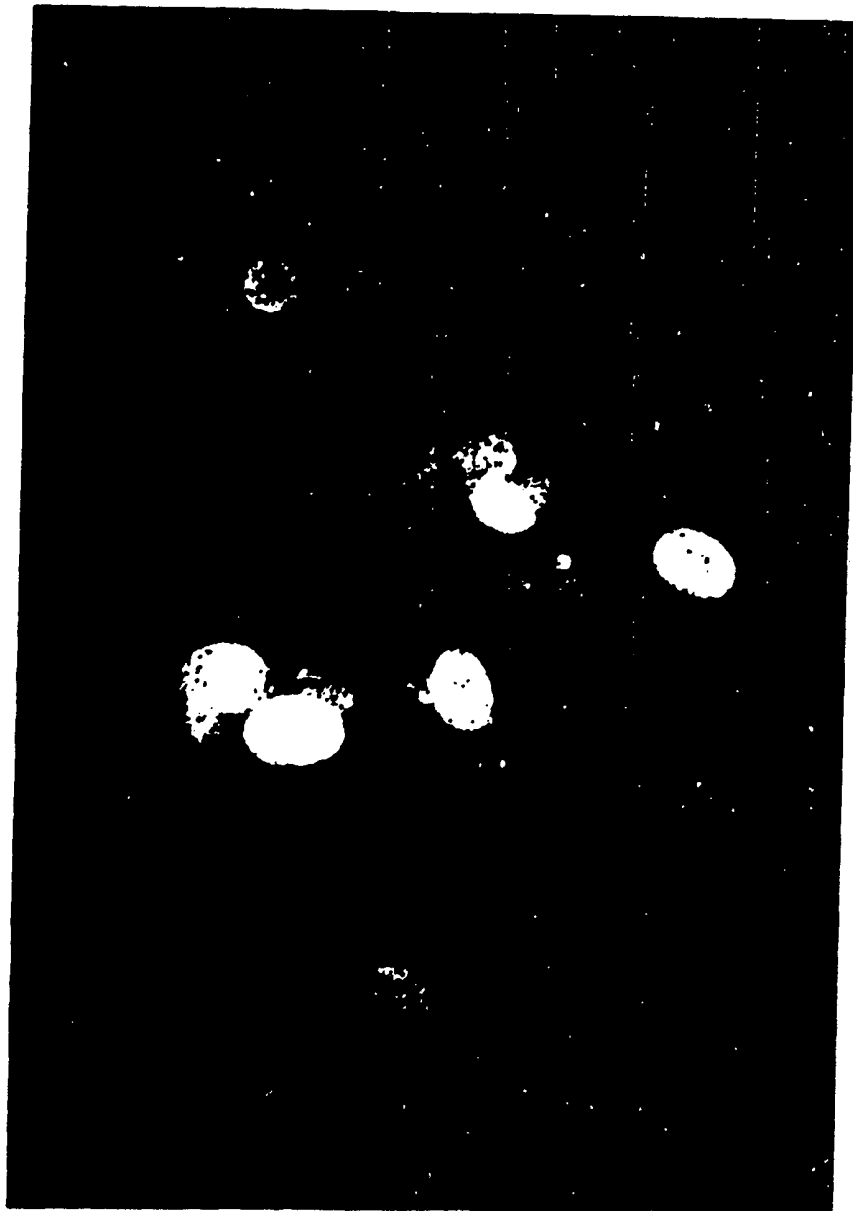


Figure 38

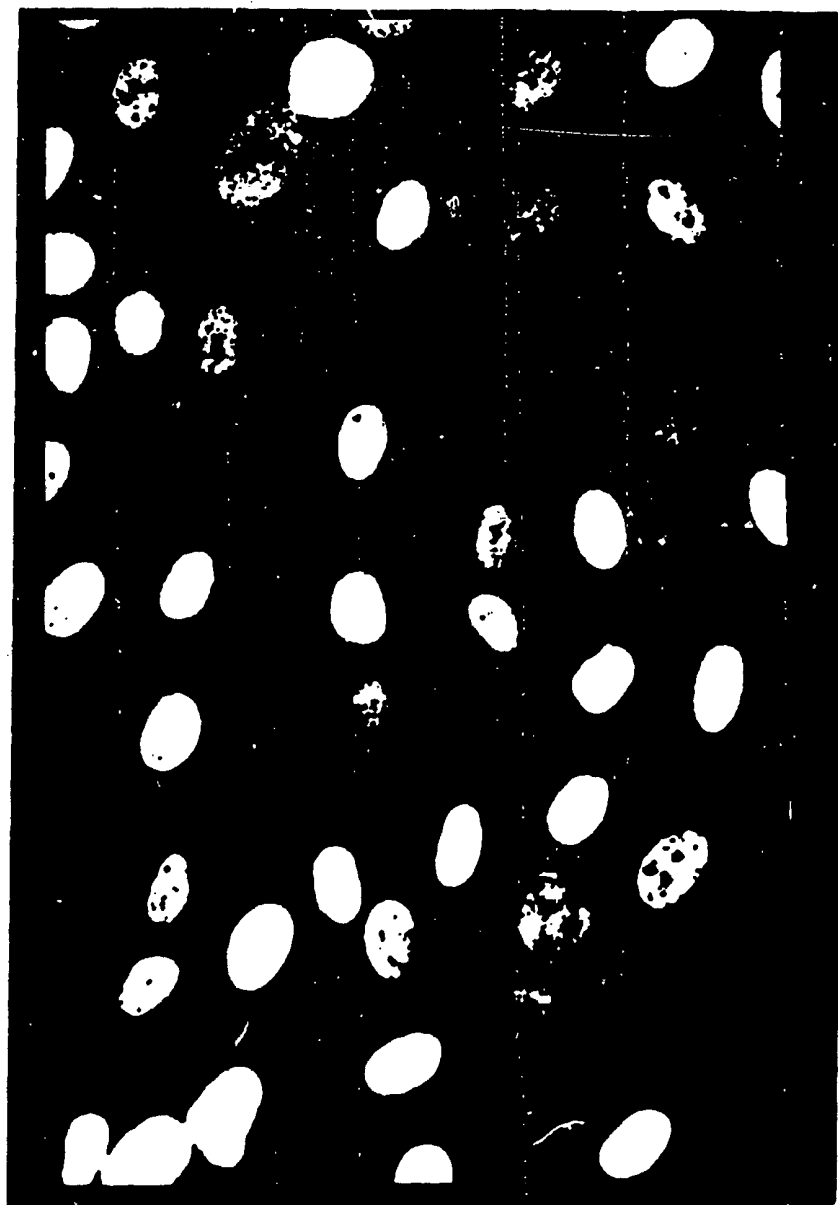


Figure 4

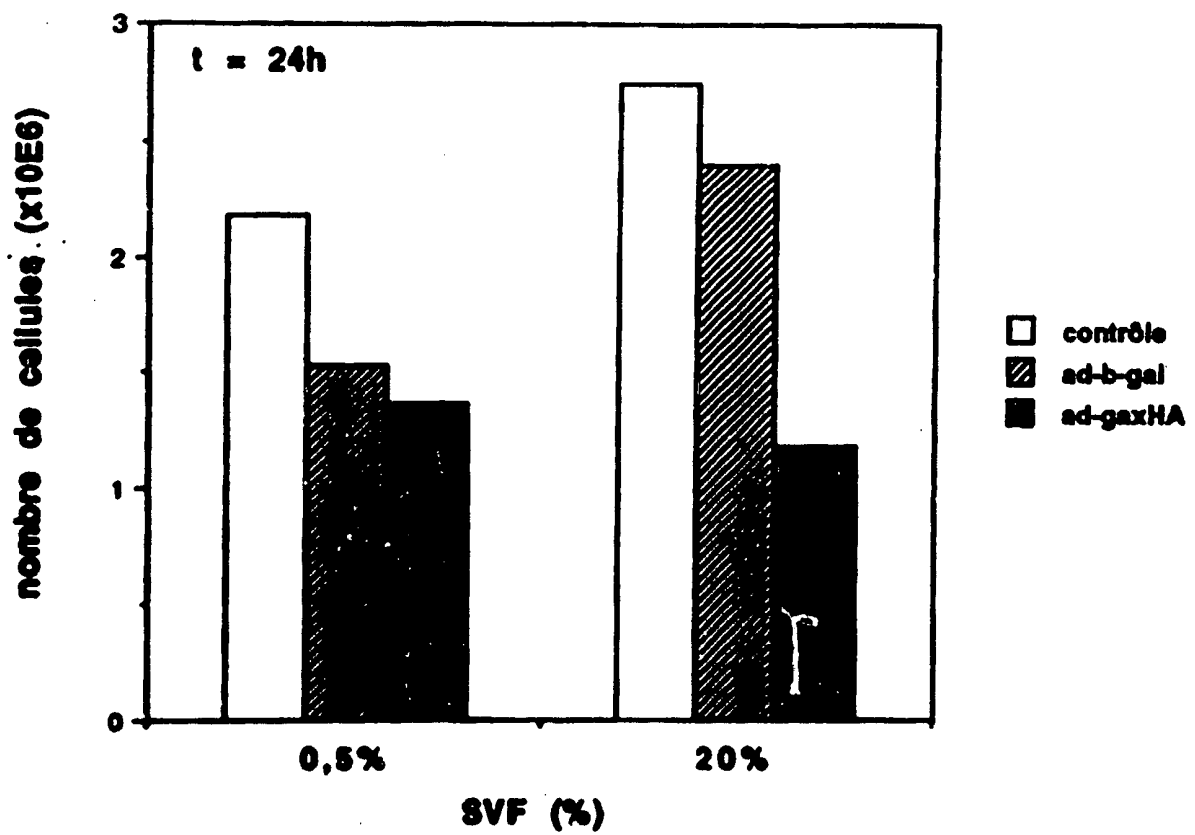


Figure 5

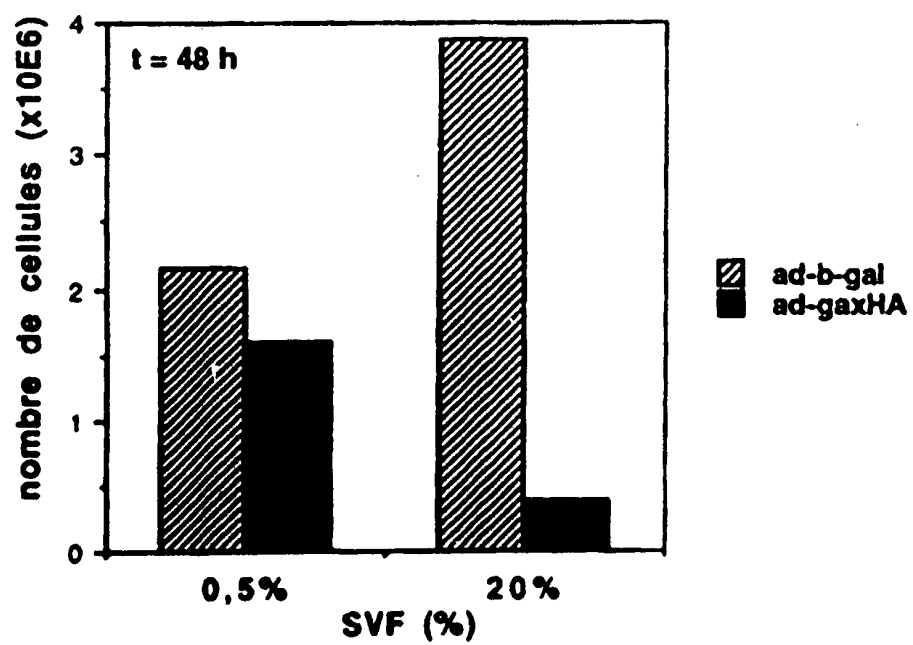


Figure 6

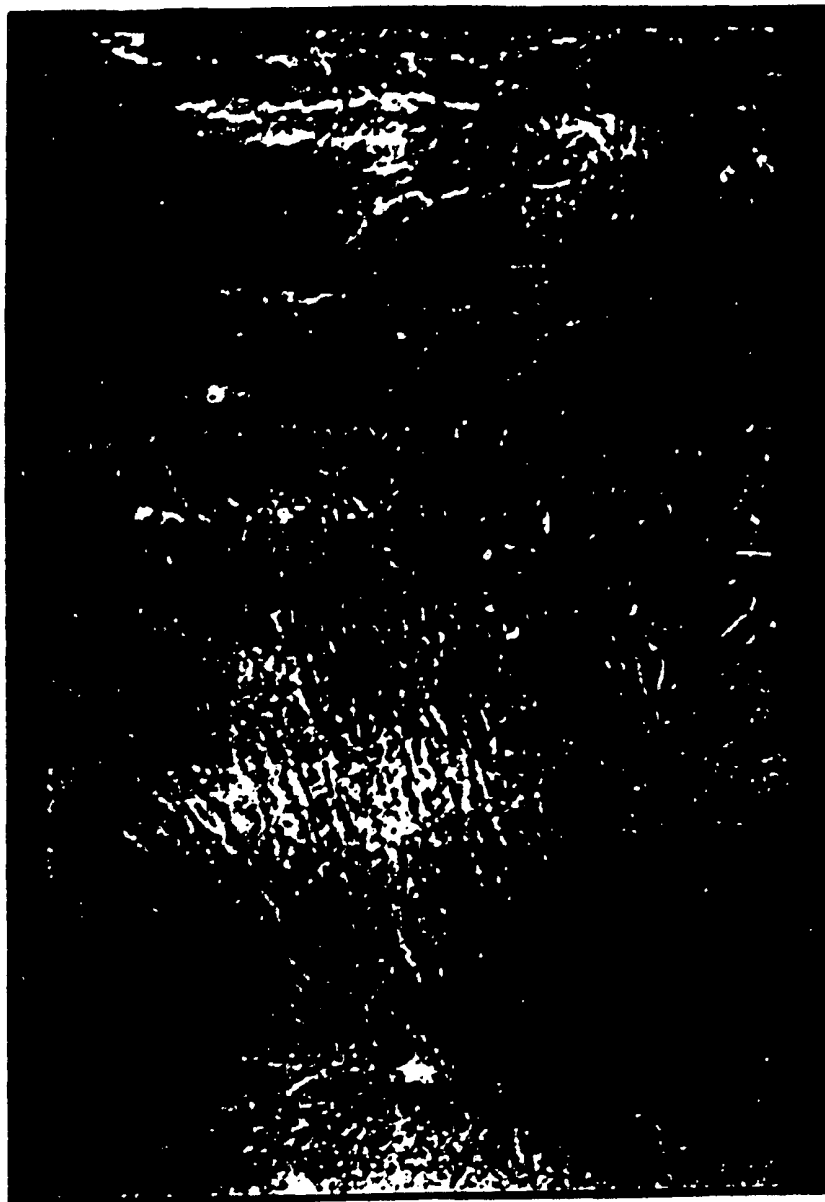


Figure 7A

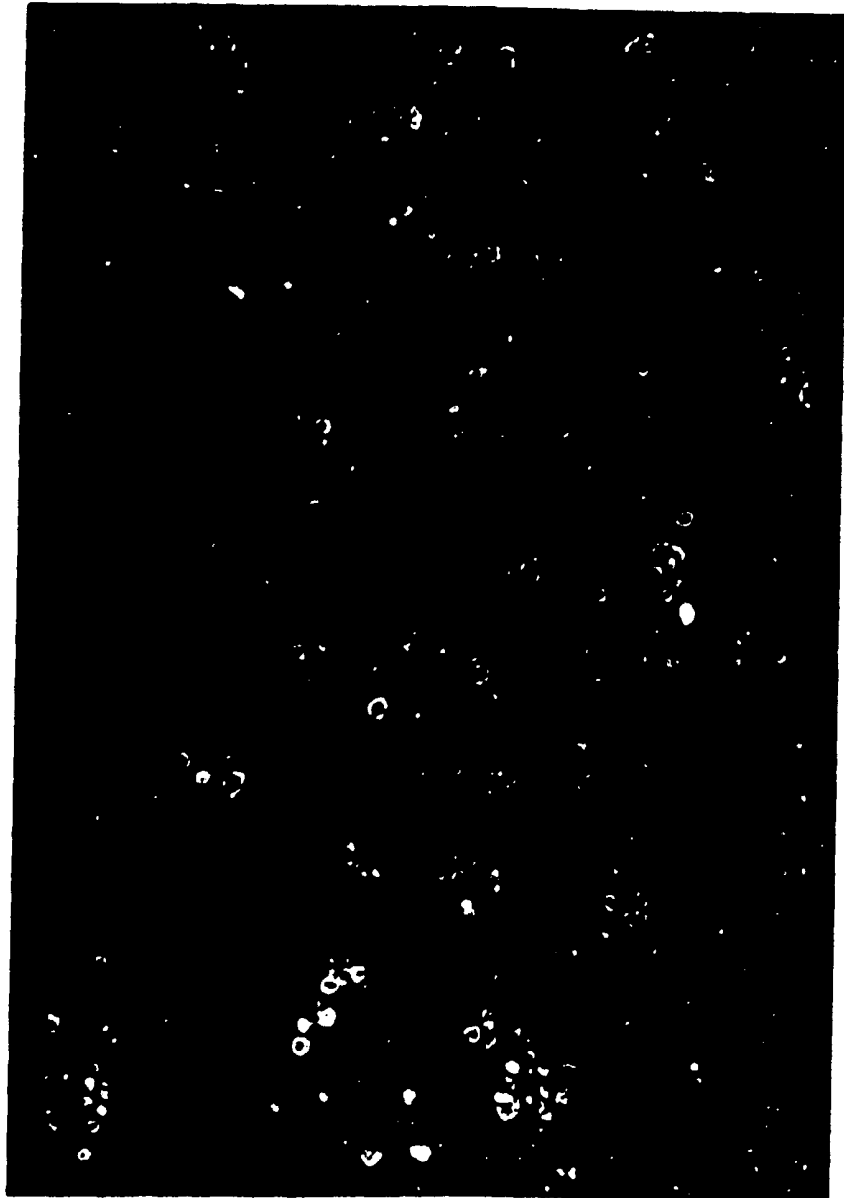


Figure 7C

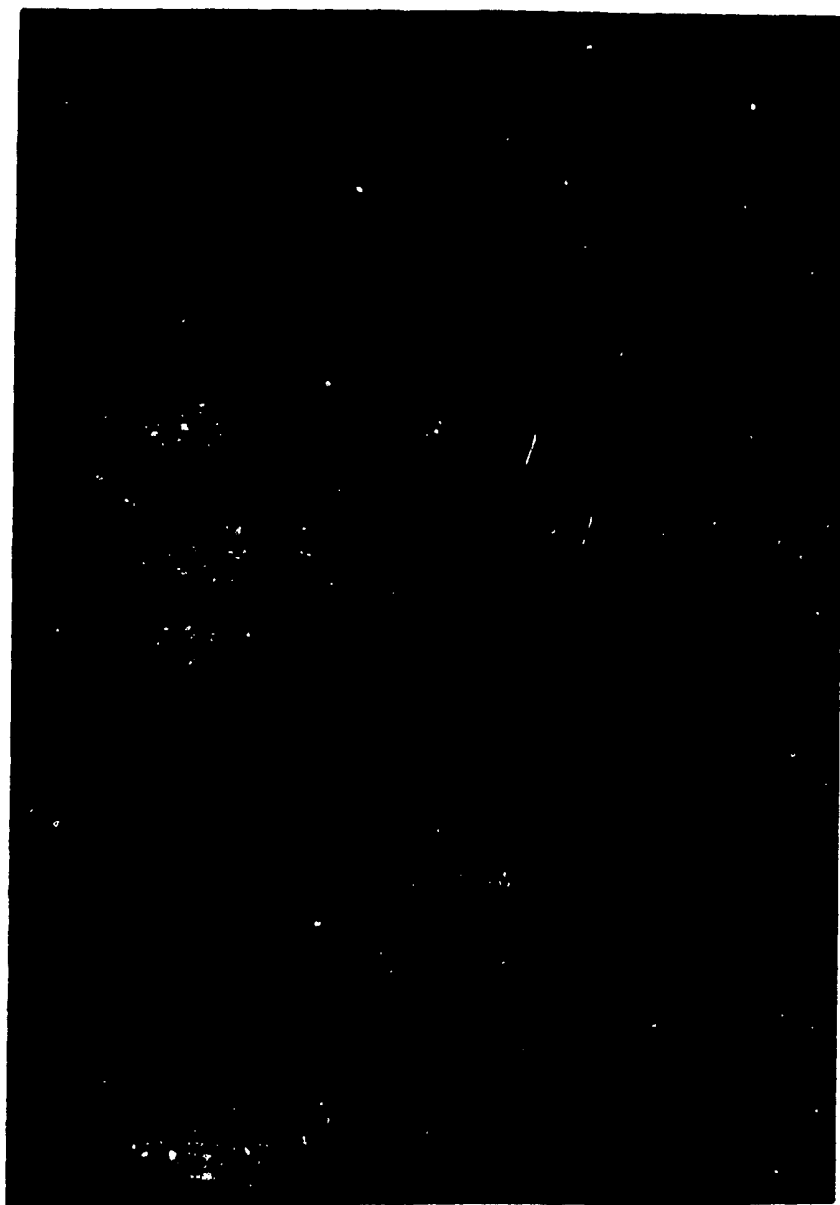


Figure 78

## GRANT SUBMITTED

Targeted gene therapy for hemophilia A  
(National Institutes of Health #HL 53665)

**Funding period:**

October 1, 1994 - June 30, 2000 (*initial application*)\  
[Submission date: March 4, 1994]

July 1, 2000 - June 30, 2004 (*renewal application*)  
[Submission date: March 1, 1999]

Principal Investigator: Wadie F. Bahou

AA

DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES  
PUBLIC HEALTH SERVICE

# GRANT APPLICATION

Follow instructions carefully. Type in the unshaded areas only.  
Type density must be 10 c.p.i.

LEAVE BLANK FOR PHS USE ONLY.

Type	Activity	Number
Review Group		Formerly
Council/Board (Month, Year)		Date Received

1. TITLE OF PROJECT (Do not exceed 56 typewriter spaces.)  
Targeted Gene Therapy for Hemophilia A

2a. RESPONSE TO SPECIFIC REQUEST FOR APPLICATIONS OR PROGRAM ANNOUNCEMENT ☐ NO ☒ YES (If "YES," state number and title)  
Number: HL-94-007-B Title: Gene Therapy for Hemophilias A and B

2b. TYPE OF GRANT PROGRAM RFA  
3. PRINCIPAL INVESTIGATOR/PROGRAM DIRECTOR  
3b. DEGREE(S) MD  
3c. SOCIAL SECURITY NO.

3a. NAME (Last, first, middle)  
Bahou, Wadie F.

3d. POSITION TITLE  
Assistant Professor of Medicine  
3e. MAILING ADDRESS (Street, city, state, zip code)  
Division of Hematology  
HSC T15-040  
SUNY at Stony Brook  
Stony Brook, NY 11794-8151

3f. DEPARTMENT, SERVICE, LABORATORY, OR EQUIVALENT  
Medicine

3g. MAJOR SUBDIVISION  
School of Medicine

3h. TELEPHONE AND FAX (Area code, number and extension)  
TEL: 516-444-2059  
FAX: 515-444-7530

4. HUMAN SUBJECTS ☒ YES ☐ NO ☐ IF "YES," exemption no. or IRB approval date 4b. Assurance of compliance no.  
5. VERTEBRATE ANIMALS ☐ NO ☒ YES pending A3011-01

6. DATES OF ENTIRE PROPOSED PROJECT PERIOD  
From (MMDDYY) 10/1/94 Through (MMDDYY) 9/30/99  
7. COSTS REQUESTED FOR INITIAL BUDGET PERIOD  
7a. Direct Costs (\$) 207,204  
8. COSTS REQUESTED FOR ENTIRE PROPOSED PROJECT PERIOD  
8a. Direct Costs (\$) 1,202,052  
8b. Total Costs (\$) 1,762,097

9. PERFORMANCE SITES (Organizations and addresses)  
Division of Hematology and  
Department of Microbiology  
School of Medicine  
SUNY at Stony Brook  
Stony Brook, NY 11794-8151  
10. INVENTIONS AND PATENTS (Competing continuation application only)  
☐ NO ☐ YES ☐ IF "YES," previously reported ☐ Not previously reported

11. NAME OF APPLICANT ORGANIZATION  
The Research Foundation of SUNY  
ADDRESS Office of Research Services  
State University of New York  
Stony Brook, New York 11794-3366

12. TYPE OF ORGANIZATION  
☐ Public: Specify ☐ Federal ☐ State ☐ Local  
☒ Private Nonprofit ☐ Forprofit (Small Business)  
☐ Forprofit (General)

13. ENTITY IDENTIFICATION NUMBER 1146013200-F7  
Congressional District 01

14. BIOMEDICAL RESEARCH SUPPORT GRANT CREDIT  
Code: 01 Identification: School of Medicine

15. NAME OF ADMINISTRATIVE OFFICIAL TO BE NOTIFIED IF AWARD IS MADE  
Katherine L. MacCormack  
TELEPHONE (516) 632-9039  
FAX (516) 632-6963  
TITLE Associate for Sponsored Programs  
ADDRESS The Research Foundation of SUNY  
Office of Research Services  
State University of New York  
Stony Brook, New York 11794-3366  
KMACCORMACK@SBCCMAIL.BITNET

16. NAME OF OFFICIAL SIGNING FOR APPLICANT ORGANIZATION  
Katherine L. MacCormack  
TELEPHONE (516) 632-9039  
FAX (516) 632-6963  
TITLE Associate for Sponsored Programs  
ADDRESS The Research Foundation of SUNY  
Office of Research Services  
State University of New York  
Stony Brook, New York 11794-3366  
KMACCORMACK@SBCCMAIL.BITNET

BITNET/INTERNET ADDRESS

17. PRINCIPAL INVESTIGATOR/PROGRAM DIRECTOR ASSURANCE: I agree to accept responsibility for the scientific conduct of the project and to provide the required progress reports if a grant is awarded as a result of this application. Willful provision of false information is a criminal offense (U.S. Code, Title 18, Section 1001). I am aware that any false, fictitious, or fraudulent statement may, in addition to other remedies available to the Government, subject me to civil penalties under the Program Fraud Civil Remedies Act of 1986 (45 CFR 79).

18. CERTIFICATION AND ACCEPTANCE: I certify that the statements herein are true and complete to the best of my knowledge, and accept the obligation to comply with Public Health Service terms and conditions if a grant is awarded as the result of this application. A willfully false certification is a criminal offense (U.S. Code, Title 18, Section 1001). I am aware that any false, fictitious, or fraudulent statement may, in addition to other remedies available to the Government, subject me to civil penalties under the Program Fraud Civil Remedies Act of 1986 (45 CFR 79).

SIGNATURE OF PERSON NAMED IN 3a. (In ink. "Per" signature not acceptable.)  
Wadie F. Bahou  
DATE 3/1/94

SIGNATURE OF PERSON NAMED IN 16. (In ink. "Per" signature not acceptable.)  
Katherine L. MacCormack  
DATE 3/1/94

DESCRIPTION: State the application's broad, long-term objectives and specific aims, making reference to the health relatedness of the project. Describe concisely the research design and methods for achieving these goals. Avoid summaries of past accomplishments and the use of the first person. This abstract is meant to serve as a succinct and accurate description of the proposed work when separated from the application. DO NOT EXCEED THE SPACE PROVIDED.

Hemophilia A is the second most common congenital bleeding disorder worldwide, accounting for approximately 90% of hemophilia. Adequate hemostasis requires a minimal plasma factor VIII (FVIII) concentration (10 - 50 ng/ml; < 0.25 nM), suggesting that even inefficient systemic delivery systems may be successful. We propose that two primary cells would be appropriate for targeted gene delivery of FVIII: vascular endothelial cells (EC) and megakaryocyte/platelets. These cells (1) are intimately associated with the blood; (2) express von Willebrand factor (vWf), which is required for maximal FVIII expression; and (3) are relatively easily targeted. Systemic delivery will be achieved by EC-specific targeting, while local hemostatic control should be achievable by delivery of FVIII to sites of hemorrhage by megakaryocyte/platelet targeting. The vector of choice in this proposal is adeno-associated virus (AAV), which in the absence of its helper virus integrates as a stable provirus into the human genome, independent of the cell's proliferative state. Except for the terminal repeats, integration of AAV into the genome requires no transcriptional regulatory elements, reducing the risk of oncogenesis and allowing foreign promoters inserted into these viruses to retain normal function. Preliminary data using recombinant AAV/ $\beta$ -galactosidase (rAAV/lacZ) reporter constructs have established the tropism of this virus for cultured human umbilical-vein ECs *in-vitro*, and infusional studies of the same virus have demonstrated systemic delivery to rat vascular endothelium *in vivo*, as determined by DNA *in-situ* PCR and lacZ-specific primers. This grant will focus on the generation of two FVIII deletion constructs for proposed rAAV/FVIII delivery systems: FVIII $\Delta$ 880 and FVIII $\Delta$ 970. Based on previous work in these and other laboratories, the size of these constructs should not interfere with rAAV packaging and replication constraints, nor functional FVIII expression. A minimum-length cell-specific vWF promoter will be characterized and used to drive EC expression, and a similar strategy will be utilized for megakaryocyte/platelet-specific expression using the platelet factor 4 (PF4) promoter. Novel methods designed to overcome rAAV size constraints and modest viral titers will be explored, including generation of adenovirus/rAAV hybrids and liposome/rAAV conjugates. After initial *in-vitro* studies, animal models will be used to further study and develop *in-vivo* expression systems: (1) a transgenic mouse model (expression in platelets); (2) a normal mouse model (megakaryocytes and endothelial cells); and (3) normal and hemophilic dog models (clinical efficacy). Although this proposal specifically addresses methods for FVIII delivery, the results may be generally applicable to a wide variety of gene-targeting strategies.

PERSONNEL ENGAGED ON PROJECT, INCLUDING CONSULTANTS/COLLABORATORS. Use continuation pages as needed to provide the required information in the format shown below on all individuals participating in the scientific execution of the project.

Name	Wadie Bahou	Degree(s)	MD	Social Security No.	034-44-3549
Position Title	Asst. Professor	Date of Birth (MM/DD/YY)	11/19/53	Role on Project	PI
Organization	SUNY Stony Brook School of Medicine			Department	Medicine
Name	Nicholas Muzyczka	Degree(s)	PhD	Social Security No.	135-40-4648
Position Title	Assoc. Professor	Date of Birth (MM/DD/YY)	2/11/47	Role on Project	Coinvestigator
Organization	SUNY Stony Brook School of Medicine			Department	Microbiology
Name	Patrick Hearing	Degree(s)	PhD	Social Security No.	216-68-0873
Position Title	Assoc. Professor	Date of Birth (MM/DD/YY)	10/26/54	Role on Project	Coinvestigator
Organization	SUNY Stony Brook School of Medicine			Department	Microbiology
Name	Jolyon Jesty	Degree(s)	PhD	Social Security No.	041-56-0018
Position Title	Professor	Date of Birth (MM/DD/YY)	8/10/46	Role on Project	Coinvestigator
Organization	SUNY Stony Brook School of Medicine			Department	Medicine
Name	Xiaohuai Zhou	Degree(s)	PhD	Social Security No.	415-49-5118
Position Title	Research Associate	Date of Birth (MM/DD/YY)	7/30/64	Role on Project	Postdoctoral
Organization	SUNY Stony Brook School of Medicine			Department	Microbiology
Name	Dimitri Gnatenko	Degree(s)	PhD	Social Security No.	078-82-4744
Position Title	Research Associate	Date of Birth (MM/DD/YY)	3/8/64	Role on Project	Postdoctoral
Organization	SUNY Stony Brook School of Medicine			Department	Medicine
Name	Humayan Mirza	Degree(s)	MD	Social Security No.	131-76-7223
Position Title	Clinical fellow	Date of Birth (MM/DD/YY)	5/10/59	Role on Project	Postdoctoral
Organization	SUNY Stony Brook School of Medicine			Department	Medicine